

水发产品中甲醛快速检测方法的比较研究

聂小林¹, 汪开银¹, 游京晶², 李淑慧¹, 王倩¹, 熊晓辉^{2*}

(1. 国家轻工业食品质量监督检测南京站, 南京 211800; 2. 南京工业大学食品与轻工学院, 南京 211800)

摘要: **目的** 比较快速检测水发产品中甲醛的方法。**方法** 本研究以 4-氨基-3-联氨-5-巯基-1, 2, 4-三氮杂茂(4-amino-3-hydrazine-5-mercapto-1, 2, 4-triazo, AHMT)法(比色卡法)、AHMT 法(分光光度法)和乙酰丙酮法(分光光度法)作为水发产品中甲醛的快速检测手段。试样中的甲醛经提取后, 在碱性条件下与 AHMT 反应, 再被高碘酸钾氧化成紫红色络合物或在沸水浴条件下与乙酰丙酮反应, 生成黄色物质。通过比色进而建立的快速检测甲醛含量的方法。**结果** 经方法学验证表明, 以竹笋、牛肚、银鱼作为空白基质的检测限为 5 mg/kg, 3 种方法的灵敏度均 $\geq 95\%$ 、特异性均 $\geq 85\%$ 、假阴性率均 $\leq 5\%$ 和假阳性率均 $\leq 15\%$ 。**结论** 该方法快速准确, 灵敏度高, 可适用于水发产品中甲醛的快速测定。

关键词: 甲醛; 水发产品; 方法学验证; 快速检测

Research on rapid detection of formaldehyde in hydrated products

NIE Xiao-Lin¹, WANG Kai-Yin¹, YOU Jing-Jing², LI Shu-Hui¹, WANG Qian¹, XIONG Xiao-Hui^{2*}

(1. National Light Industry Food Quality Supervision and Inspection in NanJing, NanJing 211800, China;
2. College of Food and Light Industry, Nanjing Tech University, NanJing 211800, China)

ABSTRACT: Objectvie To compare some rapid methods to detect formaldehyde in hydrated products. **Methods** This study used the 4-Amino-3-hydrazine-5-mercapto-1, 2, 4-triazo(AHMT) method (colorboard method), the AHMT method (spectrophotometric method) and the acetylacetone method (spectrophotometric method) as rapid detection methods for formaldehyde in hydrated products. After the formaldehyde in the sample was extracted, it reacted with the AHMT under alkaline conditions, and was then oxidized by potassium periodate to a purple-red complex or reacted with acetylacetone in a boiling water bath to produce a yellow substance. A method for rapid detection of formaldehyde content was established by colorimetry. **Results** Verification showed when used bamboo shoots, tripe and silverfish as blank matrix, the detection limit was 5 mg/kg. The sensitivity of the three methods $\geq 95\%$, the specificity $\geq 85\%$, the false negative rate $\leq 5\%$, and the false positive rate $\leq 5\%$. **Conclusion** The method is rapid, accurate and sensitive, suitable for the rapid detection of formaldehyde in hydrated products.

KEY WORDS: formaldehyde; hydrated products; methodological validation; rapid detection

基金项目: 国家市场监督管理总局研究项目。

Fund: Supported by Research Projects of the State Administration for Market Regulation

*通讯作者: 熊晓辉, 教授, 主要研究方向为食品生物技术、发酵工程。E-mail: xxh@njtech.edu.cn

*Corresponding author: XIONG Xiao-Hui, Professor, College of Food and Light industry, Nanjing Tech University. 30 Puzhu South Road, Nanjing 211800, China. E-mail: xxh@njtech.edu.cn

1 引言

甲醛(HCHO), 又称蚁醛, 在室温下是一种无色、有刺激气味的气体, 易挥发, 易溶于水、醇等溶剂。通常甲醛水溶液(30%~40%)称为福尔马林, 是有刺激气味的无色液体。甲醛是一种破坏细胞蛋白质的毒性物质, 直接作用于氨基、巯基和羧基, 生成次甲基衍生物, 从而破坏机体蛋白质和酶, 干扰细胞正常代谢, 起到杀菌和防腐的作用^[1]。长期接触低浓度甲醛, 可能会引起神经系统、免疫系统、呼吸系统和肝脏的损伤, 出现头昏、乏力、嗜睡、食欲减退、视力下降等症状^[2]。2017年10月27日, 世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单^[3], 甲醛在一类致癌物清单中。由于甲醛能延长水发产品以及水产品的保鲜时长, 延缓其腐败变质的速度, 一些不法商贩, 为了能更多地牟取利益, 使用甲醛防腐溶液(福尔马林)浸泡银鱼、海参、鱿鱼等水发产品。水发产品及水产品中的甲醛, 即使清洗、烹调也无法完全根除, 因此我国早已禁止其应用于食品中。

国内与甲醛检测相关的标准主要有: SC/T 3025-2006《水产品中甲醛的测定》^[4]、GB/T 5750.10-2006《生活饮用水标准检验方法 消毒副产物指标》^[5]、NY/T 1283-2007《香菇中甲醛含量的测定》^[6]、GB/T 21126-2007《小麦粉和大米粉及其制品中甲醛次硫酸氢钠含量的测定》^[7]和 GB 31604.48-2016《食品安全国家标准 食品接触材料及制品甲醛迁移量的测定》^[8]。本研究通过甲醛标准方法和市场快检方法, 综合考虑成本、快速、市场等因素, 建立水发产品中甲醛的快速检测比色卡法和分光光度法。

目前市场上甲醛的快检试剂盒有酚试剂法、间苯三酚法、乙酰丙酮法和4-氨基-3-联氨-5-巯基-1, 2, 4-三氮杂茂(4-amino-3-hydrazine-5-mercapto-1, 2, 4-triazole, AHMT)法。酚试剂(3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate, MBTH)的稳定性较差, 即使在4℃冰箱内保持也仅可以保存3 d, 间苯三酚法的溶液中碱浓度高, 显色和褪色反应速度太快, 通常反应时间只有30 s, 随后颜色会快速退去, 10 min左右就完全褪色, 不利于观察。而国标方法甲醛检测需将样品在磷酸介质中加热蒸馏提取, 液相色谱法成本高、人员要求高, 检测步骤复杂, 不利于快速检测, 因此研究水发产品甲醛的快速检测为食品安全提供有力的快检技术手段。本研究建立快速检测水发产品中甲醛的方法。以期在水发产品中甲醛的检测提供快速测定的方法。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

2.1.1 样品

竹笋、牛肚均购自南京本地超市、银鱼购买于苏州太湖

一家水产店, 经 SC/T 3025-2006《水产品中甲醛的测定》^[4]高效液相色谱法测试, 本底不含甲醛。

2.1.2 试剂

氢氧化钾、盐酸、亚铁氰化钾、乙酸锌、冰乙酸、乙二醇四乙酸二钠、高碘酸钾、4-氨基-3-联氨-5-巯基-1, 2, 4-三氮杂茂(AHMT)、无水乙酸钠、乙酰丙酮(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醛标准品溶液(浓度为100 μg/mL, GSB07-3141-2014 104122, 环境保护部标准样品研究所)。

2.1.3 仪器设备

TopPette手动单道移液器(大龙兴创实验仪器(北京)有限公司); QL-866 涡旋混合器(其林贝尔仪器制造有限公司); BPI-B-4 电子天平(深圳市嘉英电子有限公司); TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂); UV-1800D 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); HH-6 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 试样处理

准确称取试样1 g(精确至0.01 g)或吸取试样1.0 mL, 置于15 mL离心管中, 加水至10 mL, 涡旋提取1 min, 静置5 min, 取上清液作为提取液(如上清液浑浊, 加入1 mL 106 g/L 亚铁氰化钾溶液和1 mL 220 g/L 乙酸锌溶液, 涡旋混匀, 4000 r/min 离心5 min 或滤纸过滤, 取上清液或滤液作为提取液)。

2.2.2 测定^[9,10]

比色卡法: 准确移取提取液2 mL于5 mL离心管中, 加入0.4 mL 100 g/L 乙二醇四乙酸二钠溶液和0.4 mL 5 g/L AHMT溶液, 涡旋混匀后静置10 min, 再加入0.1 mL 15 g/L 高碘酸钾溶液, 涡旋混匀后静置5 min, 立即与标准色阶卡目视比色, 10 min内判读结果。进行平行试验, 2次测定结果应一致, 即显色结果无肉眼可辨识差异。

AHMT 分光光度法: 前处理同上, 以零管调节零点, 于波长550 nm处测定吸光度。

乙酰丙酮分光光度法: 准确移取提取液2 mL置于5 mL离心管中。于试样管中分别加入0.2 mL 乙酰丙酮溶液, 涡旋混匀后沸水浴5 min, 取出冷却至室温后以零管调节零点, 于波长413 nm处测定吸光度。

2.2.3 标准曲线的建立

用甲醛标准溶液配制相当于0、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μg 甲醛含量的标准系列, 同样品按照AHMT和乙酰丙酮的分光光度法的测定步骤检测, 以甲醛含量为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线。在线性范围内, 相关系数 r^2 在0.9990~0.9999。

2.2.4 标准比色卡的制备

将甲醛标准溶液配制成0、0.5、1、2、5、10、20 mg/L浓度的甲醛标准系列工作液, 同样品按照AHMT比色卡法测定, 得到浓度系列为0、5、10、20、50、100、200(mg/kg)

或 mg/L)甲醛标准比色卡, 见图 1。

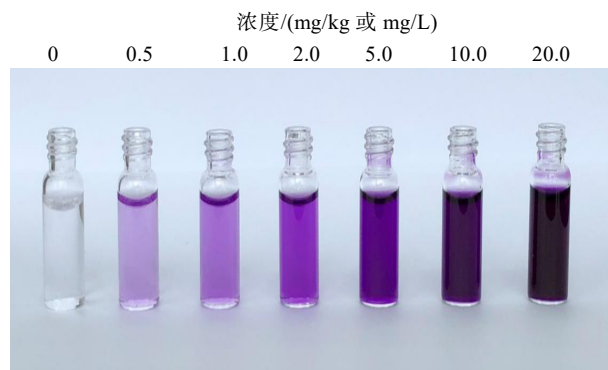


图 1 甲醛标准比色卡
Fig.1 Formaldehyde standard colorboard

2.2.5 产品方法性能指标的测定

以银鱼、牛肚和竹笋为代表的空白基质样品, 添加甲醛标准溶液, 分别制成 0 mg/kg(空白)、5 mg/kg[检测限(limit of detection, LOD)]、10 mg/kg(2 倍 LOD)、20 mg/kg (4 倍 LOD)4 个添加水平的样本的样本各 50 份, 按前处理方法和检测步骤进行测定。

2.2.6 交叉反应

以银鱼为代表的空白基质样品, 分别加入乙醛、丙醛、丁醛、苯甲醛、水杨醛、甲醇、乙醇等标准溶液^[11], 制备成添加水平为 0、5、10、20、30、40、50、100、200 mg/kg 的系列样品, 按优化后的前处理方法和检测步骤进行测定, 考察试剂盒与上述化合物的交叉反应。交叉反应率(cross-reactivity, CR%)的计算见式(1):

$$CR\%=(\text{甲醛最低检出限}/\text{其他物质最低检出限})\times 100\% \quad (1)$$

2.2.7 与参比方法一致性

以银鱼、牛肚和竹笋为代表的空白基质样品, 添加甲醛标准溶液, 制成添加水平为 5 mg/kg 的样品各 60 份, 按 AHMT 比色卡法(第一法)、AHMT 分光光度法(第二法)、乙酰丙酮分光光度法(第三法)的前处理和检测步骤进行测定。以现行 SC/T 3025-2006《水产品中甲醛的测定》^[4]高效液相色谱法作为参比方法, 对方法一致性进行研究。

2.2.8 快检方法验证

根据方法验证要求, 南京工业大学、南京市产品质量

监督检验院、厦门市食品药品质量检验研究院和江西省药品检验检测研究院等方法验证单位对水发产品中甲醛的快速检测方法进行方法学验证。由于在实际检测过程中, 如果将甲醛加入到蛋白质含量高的样品中时, 经过一段时间后, 甲醛会与蛋白质发生反应, 生成结合态的甲醛^[12], 导致实验结果偏差较大。本次验证实验选用竹笋、银鱼、牛肚的浸泡液作为考察空白基质, 并使用仪器方法确证为阴性。称取空白基质样品适量, 分别添加制成甲醛浓度为 0 mg/kg(空白)、5 mg/kg(LOD)、10 mg/kg(2 倍 LOD)、20 mg/kg(4 倍 LOD)4 个添加水平的样本, 每个添加水平平行制备 200 份, 以盲样形式由 4 家机构验证, 按照快检方法的前处理和检测步骤进行测定。甲醛分光光度法检测水发产品银鱼、牛肚和竹笋的平均加标回收率在 68.4%~83.3%。可能是甲醛与食品中蛋白质结合, 结合的甲醛不可逆, 导致样品加标回收率低, 而 SC/T 3025-2006《水产品中甲醛的测定》^[4]4.1.7 回收率要求≥60%, 所以验证时分光光度法加标参照回收率≥60%判断为阳性, 加标回收率<60%为阴性。

3 结果与分析

3.1 前处理方法的选择与优化

在水发产品中, 甲醛以游离态和结合态 2 种形式存在^[13], 考虑到结合态甲醛要加入磷酸或硫酸加热分解、蒸馏才能进行测定, 不符合快检的要求, 因此, 样品前处理方法的研究主要针对游离态甲醛。

3.1.1 蛋白沉淀剂的优化

加入蛋白沉淀剂(220 g/L 的乙酸锌溶液+106 g/L 的亚铁氰化钾溶液)可能会对甲醛进行吸附和对 AHMT 方法的显色产生影响, 因此对加入蛋白沉淀剂进行实验。称取 1 g 银鱼 10 份于 20 个离心管中, 各加浓度为 50 μg/mL 的甲醛标准品溶液 2 mL, 将 20 个离心管分成 2 组, 每组 10 个, 一组加入水 6 mL, 再加入 1 mL 试剂乙酸锌溶液和 1 mL 亚铁氰化钾溶液; 另一组加入 8 mL 水。之后 2 组同时经涡旋提取和离心后, 取上清液 2 mL 按 AHMT 分光光度法和乙酰丙酮分光光度法测定吸光度, 比较吸光度的变化。结果表明加入蛋白沉淀剂吸光值变化不大, 不会对甲醛进行吸附和显色产生影响。检测结果见表 1, 表 2。

表 1 蛋白沉淀剂对 AHMT 法检测吸光度的影响
Table 1 Effect of protein precipitators on detection results of AHMT method

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	吸光度平均值	相对标准偏差/%
不加蛋白沉淀剂	0.594	0.584	0.619	0.592	0.575	0.601	0.573	0.582	0.612	0.591	0.592	1.65
加入蛋白沉淀剂	0.611	0.633	0.615	0.635	0.616	0.595	0.602	0.604	0.591	0.584	0.606	

表 2 蛋白沉淀剂对乙酰丙酮法检测吸光度的影响
Table 2 Effect of protein precipitators on detection results of acetylacetone spectrophotometry method

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	吸光度平均值	相对标准偏差/%
不加蛋白沉淀剂	0.160	0.172	0.168	0.172	0.176	0.181	0.180	0.183	0.164	0.179	0.1735	1.77
加入蛋白沉淀剂	0.188	0.183	0.182	0.178	0.178	0.162	0.173	0.163	0.185	0.187	0.1779	

3.1.2 蛋白沉淀剂用量、涡旋后提取时间、离心条件优化
AHMT 法：分别对蛋白沉淀剂用量、涡旋提取时间、离心条件进行了优化。在样品提取液中分别加入沉淀剂各 0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 时，当加沉淀剂 1.0 mL 颜色反应最深；称取 6 份样品涡旋后静置提取时间分别为 1、3、5、8、10、20 min，当提取 8~10 min 颜色反应较深，10 min 后颜色开始变浅；离心条件选取 4000 r/min 分别离心 0、1、5、10 min，其中离心 5 min 颜色最深。综合考虑提取效率、反应时间和操作过程，本研究选择提取条件为：加入 1 mL 乙酸锌溶液和 1 mL 亚铁氰化钾溶液，涡旋混匀静置 10 min，4000 r/min 离心 5 min。结果见下图 2~图 4。

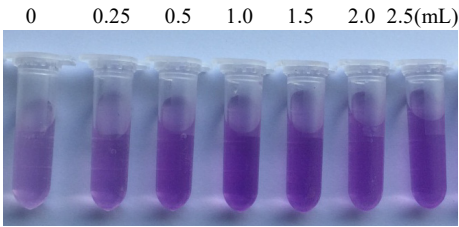


图 2 蛋白沉淀剂的使用量
Fig.2 Use of protein precipitators

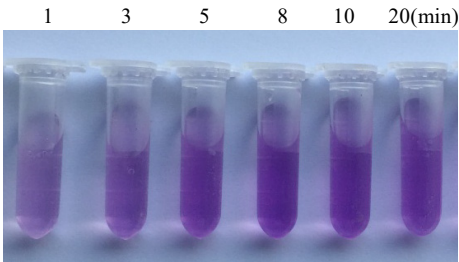


图 3 涡旋提取时间
Fig.3 Vortex extraction time

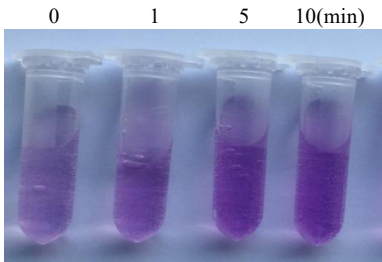


图 4 离心条件(4000 r/min)
Fig.4 Centrifugal conditions (4000 r/min)

3.1.3 试剂乙二胺四乙酸溶液、AHMT 溶液、高碘酸钾溶液和乙酰丙酮溶液使用量的优化

AHMT 法：移取 2 mL 10 μ g/mL 甲醛标准溶液于离心管中，加入一定体积的乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)溶液和 0.4 mL 的 AHMT 溶液，涡旋混匀后静置反应 10 min，向离心管中加入 0.2 mL 高碘酸钾溶液，涡旋混匀后静置显色 5 min，立即观察颜色。当 EDTA 溶液的加入体积为 0.4 mL 时，颜色反应最深，因此，选取 0.4 mL 作为 EDTA 溶液的加入量。移取 2 mL 10 μ g/mL 甲醛标准溶液于离心管中，加入 0.4 mL EDTA 溶液和一定体积的 AHMT 溶液，涡旋混匀后静置反应 10 min，向离心管中加入 0.2 mL 高碘酸钾溶液，涡旋混匀后静置显色 5 min，立即观察颜色。当 AHMT 溶液的加入体积为 0.4、0.5、0.6、0.7 和 0.8 mL 时，颜色最深，根据节约原则，选取 0.4 mL 作为 AHMT 溶液的加入量。移取 2 mL 10 μ g/mL 甲醛标准溶液于离心管中，加入 0.4 mL EDTA 溶液和 0.4 mL AHMT 溶液，涡旋混匀后静置反应 10 min，向离心管中加入一定体积的高碘酸钾溶液，涡旋混匀后静置显色 5 min，立即观察颜色。当高碘酸钾溶液的加入体积为 0.1 mL 时，颜色最深，因此，选取 0.1 mL 作为高碘酸钾溶液的加入量。

乙酰丙酮法：准确移取 2 mL 10 μ g/mL 甲醛标准溶液于离心管中，加入一定体积的乙酰丙酮溶液，涡旋混匀后，沸水浴中反应 10 min，取出冷却至室温，将显示溶液置于 1 cm 比色皿中，以空白液为参比调零，于 413 nm 测定吸光度值。乙酰丙酮溶液用量和吸光度值变化见图 5。当乙酰丙酮溶液的加入体积为 0.2 mL 时，颜色反应最深，因此，选取 0.2 mL 作为乙酰丙酮溶液的加入量。

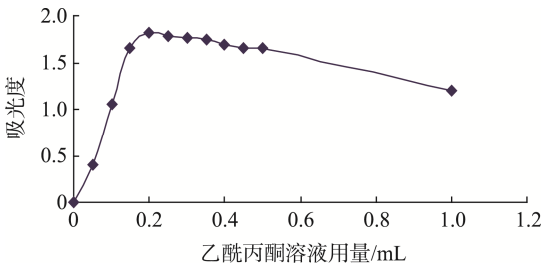


图 5 乙酰丙酮溶液使用量的优化
Fig.5 Optimization of acetylacetone solution usage

3.1.4 静置反应时间和沸水浴反应时间的优化

AHMT 法：移取 2 mL 10 μ g/mL 甲醛标准溶液于离心

管中, 加入 0.4 mL EDTA 溶液和 0.4 mL AHMT 溶液, 涡旋混匀后静置反应一定时间后, 向离心管中加入 0.1 mL 高碘酸钾溶液, 涡旋混匀后静置显色 5 min, 立即观察颜色, 涡旋混匀后静置反应时间达到 10 min 后, 颜色到达最深, 反应时间增长颜色保持一致, 因此, 设定混匀后静置反应时间为 10 min。

乙酰丙酮法: 准确移取 2 mL 10 µg/mL 甲醛标准溶液于 5 mL 离心管中, 加入 0.2 mL 乙酰丙酮溶液, 涡旋混匀后, 沸水浴中反应一定时间, 取出冷却至室温, 将显示溶液置于 1 cm 比色皿中, 以空白液为参比调零, 于 413 nm 测定吸光度值。沸水浴时间和吸光度值变化见图 6。当沸水浴时间为 5 min 时, 颜色反应达到最深, 之后不再增大, 因此, 选取 5 min 作为沸水浴时间。

3.1.5 直接提取法与蒸馏提取法的比较

以水发产品银鱼为代表的空白基质样品, 分别称取适量制成甲醛添加浓度为 10.00 mg/kg 的盲样各 20 份, 其中 10 份按照 SC/T 3025-2006《水产品中甲醛的测定》^[4]中分光光度法的样品处理(蒸馏提取法); 另外 10 份按照上述的提取方法(直接提取法)。样品处理完成后, 按照 SC/T 3025-2006《水产品中甲醛的测定》^[4]的分光光度法对甲醛进行测定。检测结果见下表 3, 蒸馏提取法的回收率在 74.6%~89.1%, 平均回收率为 82.23%; 直接提取法的回收

率在 63.50%~77.80%, 平均回收率为 70.50%。

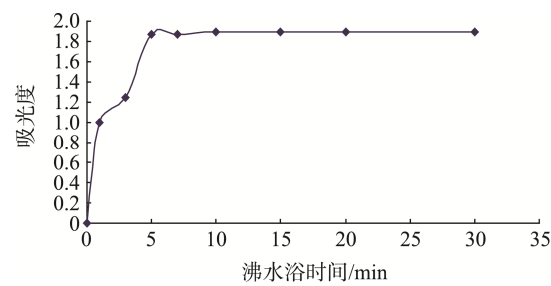


图 6 沸水浴时间的优化
Fig.6 Optimization of boiling water bath time

3.2 产品方法性能指标的测定

以银鱼、牛肚和竹笋为代表的空白基质样品, 添加甲醛标准溶液, 分别制成 0 mg/kg(空白)、5 mg/kg(LOD)、10 mg/kg(2 倍 LOD)、20 mg/kg(4 倍 LOD)4 个添加水平的样本的样本各 50 份, 按前处理方法和检测步骤进行测定。3 种方法的考察结果见表 4~表 6, 各方法的灵敏度和特异性均为 100%、假阴性率和假阳性率均为 0%, 均符合食药监科便函[2017]43 号《食品快速检测方法评价技术规范》^[14]灵敏度均≥95%、特异性均≥85%、假阴性率均≤5%和假阳性率均≤15%的要求。

表 3 银鱼的加标检测结果汇总
Table 3 Summary of detection results of silver fish

测定方法	加标检测结果/(mg/kg)										平均加标结果/(mg/kg)	平均加标回收率/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
蒸馏提取法	8.61	8.46	8.38	8.29	8.91	8.41	7.55	8.07	7.46	8.13	8.23	82.30
直接提取法	6.39	7.26	7.78	6.91	6.45	6.95	7.67	7.69	6.35	7.08	7.05	70.50

表 4 AHMT 比色卡法性能指标计算表
Table 4 Performance indicators of colorboard method

样本实际情况	银鱼			总数	牛肚			总数	竹笋			总数
	阳性	阴性			阳性	阴性			阳性	阴性		
阳性	150	0		150	150	0		150	150	0		150
阴性	0	50		50	0	50		50	0	50		50
总数	150	50		200	150	50		200	150	50		200
灵敏度(p+)	p+=150/150=100%				p+=150/150=100%				p+=150/150=100%			
特异性(p-)	p-=50/50=100%				p-=50/50=100%				p-=50/50=100%			
假阴性率(pf-)	pf-=0/150=0%				pf-=0/150=0%				pf-=0/150=0%			
假阳性率(pf+)	pf+=0/50=0%				pf+=0/50=0%				pf+=0/50=0%			
相对准确度	100%				100%				100%			
显著性差异(χ²)	-				-				-			

表 5 AHMT 分光光度法性能指标计算表
Table 5 Performance indicators of AHMT spectrophotometry

样本实际情况	银鱼		总数	牛肚		总数	竹笋		总数
	阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
阳性	150	0	150	150	0	150	150	0	150
阴性	0	50	50	0	50	50	0	50	50
总数	150	50	200	150	50	200	150	50	200
灵敏度(p+)	p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=150/150=100%		
特异性(p-)	p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%		
假阴性率(pf-)	pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%		
假阳性率(pf+)	pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%		
相对准确度	100%			100%			100%		
显著性差异(χ^2)	-			-			-		

表 6 乙酰丙酮分光光度法性能指标计算表
Table 6 Performance indicators of acetylacetone spectrophotometry

样本实际情况	银鱼		总数	牛肚		总数	竹笋		总数
	阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
阳性	150	0	150	150	0	150	150	0	150
阴性	0	50	50	0	50	50	0	50	50
总数	150	50	200	150	50	200	150	50	200
灵敏度(p+)	p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=150/150=100%		
特异性(p-)	p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%		
假阴性率(pf-)	pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%		
假阳性率(pf+)	pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%		
相对准确度	100%			100%			100%		
显著性差异(χ^2)	-			-			-		

3.3 交叉反应结果

乙醛、丙醛、丁醛、苯甲醛、水杨醛、甲醇、乙醇添加水平至 200 mg/kg 时,检测结果见图 7, 甲醛试剂盒检测结果均为阴性,表明本方法的甲醛试剂盒均与上述试剂无交叉反应,交叉反应率均为 0%。

3.4 与参比方法一致性分析结果

在检测限浓度(5 mg/kg)时,快检方法与参比方法检测结果一致,见表 7。结果均与参比方法一致,符合方法一致性要求。

3.5 验证结果与汇总

3.5.1 AHMT 比色卡法的验证

验证实验选用竹笋、银鱼、牛肚浸泡液作为考察空白基质,并使用仪器方法确证为阴性。称取空白基质样品适量,分别添加制成甲醛浓度为 0 mg/kg(空白)、5 mg/kg(LOD)、

10 mg/kg(2 倍 LOD)、20 mg/kg(4 倍 LOD)4 个添加水平的样本,每个添加水平平行制备 200 份,牵头单位和 3 家方法验证单位的验证结果见表 8~表 10。结果表明:比色卡法的灵敏度和特异性均为 100%、假阴性率和假阳性率均为 0%。符合原国家食品药品监督管理总局便函[2017]43 号《食品快速检测方法评价技术规范》^[14]的要求。

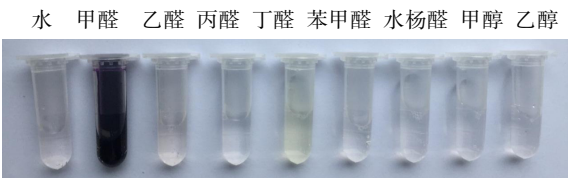


图 7 添加浓度为 200 mg/kg 的交叉反应结果
Fig.7 Cross-reaction results of 200 mg/kg addition dose

表 7 与参比方法一致性分析情况
Table 7 Analysis of conformance with reference method

参比方法 检测情况	竹笋						银鱼						牛肚					
	第一法		第二法		第三法		第一法		第二法		第三法		第一法		第二法		第三法	
	阳 性	阴 性	阳 性	阴 性	阳 性	阴 性	阳 性	阴 性	阳 性	阴 性	阳 性	阴 性	阳 性	阴 性	阳 性	阴 性	阳 性	阴 性
阳性	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0
阴性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
显著性差异 (χ^2)	-		-		-		-		-		-		-		-		-	

表 8 方法性能指标计算表(竹笋浸泡液)
Table 8 Method performance indicator table (bamboo shoots soaking solution)

样本实际情况	南京工业大学		总数	南京市产品质量 监督检验院		总数	江西省药品检验 检测研究院		总数	厦门市食品药品质量 检验研究院		总数
	阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
	阳性	阴性	总数	阳性	阴性	总数	阳性	阴性	总数	阳性	阴性	总数
阳性	150	0	150	150	0	150	150	0	150	150	0	150
阴性	0	50	50	0	50	50	0	50	50	0	50	50
总数	150	50	200	150	50	200	150	50	200	150	50	200
灵敏度(p+)	p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=150/150=100%		
特异性(p-)	p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%		
假阴性率(pf-)	pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%		
假阳性率(pf+)	pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%		
相对准确度	100%			100%			100%			100%		
显著性差异(χ^2)	-			-			-			-		

表 9 方法性能指标计算表(银鱼浸泡液)
Table 9 Method performance indicator table (silverfish soaking solution)

样本实际情况	南京工业大学		总数	南京市产品质量 监督检验院		总数	江西省药品检验 检测研究院		总数	厦门市食品药品质量 检验研究院		总数
	阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
	阳性	阴性	总数	阳性	阴性	总数	阳性	阴性	总数	阳性	阴性	总数
阳性	150	0	150	150	0	150	150	0	150	150	0	150
阴性	0	50	50	0	50	50	0	50	50	0	50	50
总数	150	50	200	150	50	200	150	50	200	150	50	200
灵敏度(p+)	p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=150/150=100%		
特异性(p-)	p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%		
假阴性率(pf-)	pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%		
假阳性率(pf+)	pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%		
相对准确度	100%			100%			100%			100%		
显著性差异(χ^2)	-			-			-			-		

3.5.2 AHMT 分光光度法的验证

验证实验选用银鱼作为考察空白基质, 并使用仪器方法确证为阴性。称取银鱼空白基质样品适量, 分别添加制成甲醛浓度为 0 mg/kg(空白)、5 mg/kg(LOD)、10 mg/kg(2 倍 LOD)、20 mg/kg(4 倍 LOD)4 个添加水平的样本, 每个添加水平平行制备 200 份, 以盲样形式 4 家方法验证单位, 按照前处理方法和检测步骤进行测定。每家方法验证单位测定样本 200 份, 4 家机构总计测定样本 800 份。验证结果见表 11。结果表明: AHMT 分光光度法灵敏度 95.3%~100%, 特异性均为 100%, 假阴性率 0%~4.7%, 假阳性率均为 0%。该法的灵敏度均≥95%、特异性均≥85%、假阴性率均≤5%和假阳

性率均≤15%, 符合原国家食品药品监督管理总局便函[2017]43 号《食品快速检测方法评价技术规范》^[14]的要求。

3.5.3 乙酰丙酮分光光度法的验证

本次验证实验选用银鱼作为考察空白基质, 分别添加制成甲醛浓度为 0 mg/kg(空白)、5 mg/kg(LOD)、10 mg/kg(2 倍 LOD)、20 mg/kg(4 倍 LOD)4 个添加水平的样本。总计测定样本 800 份。牵头单位和 3 家方法验证单位的验证结果见表 12。结果表明: 乙酰丙酮法分光光度法灵敏度 97.3%~100%, 特异性均为 100%, 假阴性率 0%~2.7%, 假阳性率均为 0%, 符合食药监科便函[2017]43 号《食品快速检测方法评价技术规范》^[14]的要求。

表 10 方法性能指标计算表(牛肚浸泡液)
Table 10 Method performance indicator table (tripe soaking solution)

样本实际情况	南京工业大学		总数	南京市产品质量 监督检验院		总数	江西省药品检验 检测研究院		总数	厦门市食品药品质量 检验研究院		总数
	阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
阳性	150	0	150	150	0	150	150	0	150	150	0	150
阴性	0	50	50	0	50	50	0	50	50	0	50	50
总数	150	50	200	150	50	200	150	50	200	150	50	200
灵敏度(p+)	p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=150/150=100%		
特异性(p-)	p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%		
假阴性率(pf-)	pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%		
假阳性率(pf+)	pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%		
相对准确度	100%			100%			100%			100%		
显著性差异(χ^2)	-			-			-			-		

表 11 方法性能指标计算表(银鱼)
Table 11 Method performance indicator table (silverfish)

样本实际情况	南京工业大学		总数	南京市产品质量 监督检验院		总数	江西省药品检验 检测研究院		总数	厦门市食品药品质量 检验研究院		总数
	阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
阳性	150	0	150	173	7	150	150	0	150	145	5	150
阴性	0	50	50	0	50	50	0	50	50	0	50	50
总数	150	50	200	143	57	200	150	50	200	145	55	200
灵敏度(p+)	p+=150/150=100%			p+=143/150=95.3%			p+=150/150=100%			p+=145/150=96.7%		
特异性(p-)	p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%		
假阴性率(pf-)	pf-=0/150=0%			pf-=7/150=4.7%			pf-=0/150=0%			pf-=5/150=3.3%		
假阳性率(pf+)	pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%		
相对准确度	100%			96.5%			100%			97.5%		
显著性差异(χ^2)	-			5.1 自由度(df)=1			-			3.2 自由度(df)=1		

表 12 方法性能指标计算表(银鱼)
Table 12 Method performance indicator table (silverfish)

样本实际情况	南京工业大学		总数	南京市产品质量 监督检验院		总数	江西省药品检验 检测研究院		总数	厦门市食品药品质量 检验研究院		总数
	阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
阳性	150	0	150	150	0	150	150	0	150	146	4	150
阴性	0	50	50	0	50	50	0	50	50	0	50	50
总数	150	50	200	150	50	200	150	50	200	146	54	200
灵敏度(p+)	p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=150/150=100%			p+=146/150=97.3%		
特异性(p-)	p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%			p-=50/50=100%		
假阴性率(pf-)	pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=0/150=0%			pf-=4/150=2.7%		
假阳性率(pf+)	pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%			pf+=0/50=0%		
相对准确度	100%			100%			100%			98%		
显著性差异(χ^2)	-			-			-			2.3 自由度(df)=1		

4 结 论

甲醛是水果、蔬菜、畜禽肉、鱼、甲壳类动物等食品中天然存在的成分。大多数食品中天然存在的甲醛含量较低,不会对健康造成危害,但是人为添加、用甲醛溶液浸泡食品、容器污染等途径引入到食品中的甲醛的含量一般会较高,会危害消费者健康^[15]。因此,本方法适用于水发产品中甲醛的快速测定,但并不能区分水发产品中甲醛的来源,所以判断水发产品中甲醛是否超标,应该根据相应的国家限量标准或方法。海水类水产品在冷冻储存过程中,其肌肉中的氧化三甲胺容易在酶的作用下分解成二甲胺和甲醛^[16-18],因此甲醛作为代谢中间产物普遍存在^[19]。虽然国家明令禁止在食物中人为添加甲醛,但判定一种食品中是否人为添加非食品原料甲醛^[20],应当扣除食品原料中的原生质本底量^[21]。由于不同种类水产品中甲醛含量差异较大,建议对常见的不同区域、不同品种、不同季节的水产品中甲醛的本底做系统分析,根据实际情况进行判定。

本研究以 16 家市售甲醛快检试剂盒产品为基础进行,选用其中 AHMT 法-比色卡法、AHMT 法-分光光度法和乙酰丙酮法-分光光度法的甲醛快检试剂盒进行方法学研究。以水发产品中的银鱼、牛肚、竹笋和这 3 种产品的浸泡液作为研究基质,测定了 3 种方法的检测限、灵敏度、特异性、交叉反应率、假阳性率和假阴性率等性能指标均符合食药监科便函[2017]43 号《食品快速检测方法评价技术规范》^[14]的要求:灵敏度均 $\geq 95\%$ 、特异性均 $\geq 85\%$ 、假阴性率均 $\leq 5\%$ 和假阳性率均 $\leq 15\%$;与参比方法进行一致性分析比较时,结果表明与参比方法阳性确证比例在 95%的置信区间内没有统计学差异或完全一致。因此,本方法适用于水发产品甲醛的快速检测。

参考文献

[1] 黄种乾, 李亚楠. 食品中甲醛分析方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(12): 28-34.
Huang ZQ, Li YN. Research progress on formaldehyde analysis method in food [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(12): 28-34.

[2] 庾莉萍. 水产品中甲醛安全问题的思考[J]. 当代畜禽养殖业, 2011, (3): 42-45.
Yu LP. Reflections on the safety of formaldehyde in aquatic products [J]. Mod Anim Husbandry, 2011, (3): 42-45.

[3] 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单[S].
WHO International agency for research on cancer list of carcinogens [S].

[4] SC/T 3025-2006 水产品中甲醛的测定[S].
SC/T 3025-2006 Determination of formaldehyde in aquatic products [S].

[5] GB/T 5750.10-2006 生活饮用水标准检验方法 消毒副产物指标[S].
GB/T 5750.10-2006 Standard examination methods for drinking water-Disinfection by products parameters [S].

[6] NY/T 1283-2007 《香菇中甲醛含量的测定》[S].
NY/T 1283-2007 Determination of formaldehyde content in lentinula edodes [S].

[7] GB/T 21126-2007 小麦粉和大米粉及其制品中甲醛次硫酸氢钠含量的测定[S].
GB/T 21126-2007 Determination of sodium formaldehyde sulfoxylate in grain products [S].

[8] GB 31604.48-2016 食品安全国家标准 食品接触材料及制品甲醛迁移量的测定[S].
GB 31604.48-2016 National food safety standard-Determination of formaldehyde migration in food contact materials and products [S].

[9] 张淑霞, 王晓文, 高亚辉, 等. 甲醛检测方法研究进展[J]. 食品工程, 2011, 26(3): 141-44.
Zhang SX, Wang XW, Gao YH. Research progress on formaldehyde detection method [J]. Food Eng, 2011, 26(3): 141-144.

[10] 刘妹瑞. 甲醛检测方法的研究进展[J]. 成都纺织高等专科学校学报, 2016, 33(4): 160.

- Liu SR. Research progress on formaldehyde detection method [J]. J Chengdu Textile Coll, 2016, 33(4): 160.
- [11] 孙青萍. AHMT 分光光度法测定水中的甲醛[J]. 西南给排水, 2005, (5): 41–42.
- Sun QP. Determination of formaldehyde in water by AHMT spectrophotometry [J]. Southwest Water Wastewater, 2005, (5): 41–42.
- [12] 韩冬娇, 李敬, 刘红英. 水产品中内源性甲醛的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 3954–3956.
- Hang DJ, Li J, Liu HY. Research progress on endogenous formaldehyde in aquatic products [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(6): 3954–3956.
- [13] 董靓靓, 朱军莉, 励建荣. 水产品中甲醛 HPLC 测定的前处理方法探索[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 64–67.
- Dong LL, Zhu JL, Li JR. Exploration of pretreatment method for HPLC determination of formaldehyde in aquatic products [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(12): 64–67.
- [14] 食品快速检测方法评价技术规范[S].
- Technical specification for evaluation of fast testing methods for food [S].
- [15] 庚晋, 周洁. 甲醛污染的危害、来源及预防[J]. 建材产品与应用, 2002, (5): 49–51.
- Geng J, Zhou J. Hazards, sources and prevention of formaldehyde pollution [J]. Build Mater Prod Appl, 2002, (5): 49–51.
- [16] Castell CH, Smith B, Neal W. Production of dimethylamine in muscle of several species of gadoid fish during frozen storage, especially in relation to presence of dark muscle [J]. J Fish Res, 1971, 28(1): 1–5.
- [17] Mackie LM, Thomson BW. Decomposition of trimethylamine oxide during iced and frozen storage of whole and comminuted tissue of fish [J]. Proc. IV Int Congress Food Sci Technol, 1974, (4): 243–250.
- [18] Hebard CE, Flick GJ, Martin RE. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish [M].
- [19] 宋丹阳, 周德庆, 杜永芳, 等. 氧化三甲胺酶研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 350–353.
- Song DY, Zhou DQ, Du YF. Advances in research on trimethylamine oxidase [J]. Food Sci, 2007, 28(1): 350–353.
- [20] Hoque MDS, Jacxsens L, Rahman MDB, *et al.* Evaluation of artificially contaminated fish with formaldehyde under laboratory conditions and exposure assessment in freshwater fish in Southern Bangladesh [J]. Chemosphere, 2017, 195(2018): 702–7129.
- [21] 段文佳, 周德庆, 张瑞玲. 鲜活水产品中甲醛本底含量状况调查[J]. 中国农学通报, 2011, 27(3): 383–390.
- Duan WJ, Zhou DQ, Zhang RL. Investigation of background concentration of formaldehyde in fishery products [J]. Chin Agric Sci Bull, 2011, 27(3): 383–390.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

聂小林, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: niexiaolin_0916@163.com

熊晓辉, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术、发酵工程。
E-mail: xxh@njtech.edu.cn